

# توسعه روش استخراج فاز جامد پخشی تلفیق شده با میکرواستخراج مایع - مایع کمک شده با هوا برای اندازه‌گیری باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدی در نمونه‌های شیر پاستوریزه به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مریم تجلائی<sup>a</sup>، آذر حقیقت آسیابر<sup>b</sup>، محمدرضا افشارمقدم<sup>c</sup>، جلیل خندقی<sup>d\*</sup>

<sup>a</sup> دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

<sup>b</sup> مربی علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

<sup>c</sup> استادیار مرکز ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران و استادیار مرکز آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

<sup>d</sup> استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران و استادیار گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۹/۳۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۵/۱۱

DOI: 10.30495/jftn.2023.74523.11269

## چکیده

**مقدمه:** باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های مواد غذایی با منشأ دامی مانند شیر می‌باشند و وجود آن‌ها در مواد غذایی می‌تواند سلامت مصرف کننده را به مخاطره اندازد. لذا پایش میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر جهت آگاهی بخشی به متولیان سلامت حائز اهمیت زیادی است و در این راستا تحقیقات متعددی برای تعیین باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در شیر با استفاده از روش‌های متنوع سنتی و کروماتوگرافی انجام شده است. در این مطالعه تلاش شد تا یک روش کارا برای اندازه‌گیری باقیمانده برخی آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدی در نمونه‌های شیر پاستوریزه توسعه و ارائه گردد.

**مواد و روش‌ها:** باقیمانده سه آنتی‌بیوتیک سولفادیازین، سولفامتوکسازول و سولفامتازین پس از روش استخراج فاز جامد پخشی تلفیق شده با میکرواستخراج مایع - مایع کمک شده با هوا از نمونه شیر پاستوریزه، با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز آرایه دیودی اندازه‌گیری شدند. پس از ارزیابی عوامل موثر در روش استخراج و بهینه‌سازی آن‌ها، اعتبارسنجی روش با محاسبه پارامترهای تجزیه‌ای مانند محدوده خطی، حدود تشخیص و اندازه‌گیری، تکرارپذیری و راندمان استخراج انجام شد.

**یافته‌ها:** در روش استخراج دو مرحله‌ای توسعه یافته ارقام شایستگی ایده‌آل حاصل شد بطوریکه خطی بودن روش با ضریب تعیین بالاتر از ۰/۹۹۵ نشان داده شد. حدود تشخیص و اندازه‌گیری به ترتیب کمتر از ۱/۲ و ۳/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر بدست آمدند که کمتر از حد مجاز باقیمانده تعیین شده برای این آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر می‌باشد. آنالیز نمونه‌های حقیقی وجود سولفامتوکسازول در سه نمونه شیر در مقادیر ۱/۱۳±۰/۱، ۰/۲±۰/۹ و ۰/۵±۰/۹ نانوگرم در میلی‌لیتر را نشان داد و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه‌های مورد مطالعه یافت نشد.

**نتیجه‌گیری:** به‌طور کلی روش توسعه داده شده روشی حساس، دقیق و قابل اعتماد بوده و از کارایی بالایی در تعیین آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی در نمونه شیر برخوردار است.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدی، استخراج فاز جامد پخشی، شیر، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، میکرواستخراج مایع - مایع پخشی کمک شده با هوا

## مقدمه

لزوم مصرف شیر در جامعه به‌خصوص برای گروه‌های سنی حساس مانند کودکان و سالخوردگان، اهمیت ایمنی و کیفیت این ماده غذایی را به‌خوبی مشخص می‌سازد. باقیمانده داروها یکی از مهم‌ترین آلوده‌کننده‌های مواد غذایی با منشاء دامی مانند شیر می‌باشند. آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله داروهای پرکاربرد مورد استفاده در صنعت دامپروری می‌باشند که برای تضمین رشد و نمو مطلوب دام‌ها و کنترل بیماری‌های باکتریایی استفاده می‌شوند (Jayalakshmi *et al.*, 2017). وجود باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی می‌تواند سلامت مصرف کننده را به مخاطره انداخته و منجر به ایجاد آلرژی، اختلالات متابولیکی، ایجاد میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و مقاومت در برابر درمان آنتی‌بیوتیکی در انسان شود (Sachi *et al.*, 2019). بنابراین بررسی و پایش میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در محصولات غذایی پرمصرفی مانند شیر جهت آگاهی بخشی به متولیان تغذیه و سلامت کشور و عموم مردم بسیار حائز اهمیت است.

با توجه به اینکه معمولاً حد مجاز باقیمانده بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی انسان در حد ppb است معمولاً از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یا HPLC<sup>۱</sup> به عنوان ابزار تجزیه‌ای دقیق و حساس برای آنالیز و تشخیص باقیمانده این آنالیت‌ها استفاده می‌گردد (Ghasemi *et al.*, 2022). با این حال، علیرغم پیشرفت‌های صورت گرفته در ساخت ابزارهای تجزیه‌ای، آنالیز نمونه‌های شیر به دلیل ماتریکس پیچیده‌ی نمونه و مقادیر غلظتی پایین داروها بدون آماده‌سازی غیرممکن می‌باشد (Afshar Mogaddam *et al.*, 2023). بنابراین، توسعه و استفاده از روش‌های آماده‌سازی آسان و کارا قبل از آنالیز نمونه‌ها بسیار حائز اهمیت است. تا به حال روش‌های مختلفی جهت آماده‌سازی نمونه‌ها به کار رفته که از این جمله می‌توان به استخراج مایع - مایع (Jeddy & Khandaghi, 2019)، استخراج فاز جامد (Mirzaei *et al.*, 2022)، استخراج فاز جامد پخشی یا DSPE<sup>۲</sup> (Zeiadi *et al.*, 2020) و میکرواستخراج مایع - مایع

پخشی یا DLLME<sup>۳</sup> (Farajpour *et al.*, 2023) اشاره کرد.

در روش DSPE، ذرات جاذب بطور مستقیم به داخل محلول نمونه اضافه شده و این ذرات براساس گروه عاملی خود، آنالیت‌های موجود در نمونه را جذب می‌کنند. سپس ذرات جاذب به وسیله‌ی ساترنیفیوژ از محلول آزمایشی جدا شده و به وسیله‌ی یک حلال قابل امتزاج با آب شسته می‌شوند تا آنالیت‌ها واجذب گردند (Anastassiades *et al.*, 2003). جاذب مورد استفاده در این روش می‌تواند کارایی استخراج را تحت تاثیر قرار دهد (Limoei & Khosrowshahi *et al.*, 2022).

در روش میکرواستخراج مایع مایع کمک شده با هوا یا AALLME<sup>۴</sup> یک حلال استخراج‌کننده غیرقابل اختلاط با آب که چگالی متفاوتی نسبت به آب دارد به داخل نمونه آبی حاوی آنالیت‌ها اضافه می‌شود. سپس مخلوط نمونه آبی و حلال استخراج‌کننده به داخل یک سرنگ شیشه‌ای کشیده شده و مجدداً به لوله آزمایش برگردانده می‌شود. این عمل چندین بار صورت می‌گیرد. طی این عمل حلال استخراج‌کننده به صورت قطرات بسیار ریزی در درون محلول آبی پخش شده و یک محلول ابری تشکیل می‌شود. سپس محلول کدر ساترنیفوژ شده و فاز آلی حاوی آنالیت‌های تغلیظ‌شده جمع‌آوری می‌گردد (Farajzadeh & Mogaddam, 2012). این روش از نظر انجام بسیار ساده بوده و در زمان کوتاهی انجام می‌شود و نیازی به حلال پخش‌کننده ندارد (Amini *et al.*, 2018).

در این کار پژوهشی باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدی سولفادیازین<sup>۵</sup>، سولفامتوکسازول<sup>۶</sup> و سولفامتازین<sup>۷</sup> در نمونه‌های مختلف شیر پاستوریزه بررسی شده است. برای این منظور ابتدا آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از روش استخراج فاز جامد پخشی تلفیق شده با میکرواستخراج مایع - مایع کمک شده با هوا از بافت نمونه شیر استخراج شده و سپس با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به دکتور آرایه دیودی یا DAD<sup>۸</sup> اندازه‌گیری شدند.

<sup>1</sup> High Performance Liquid Chromatography

<sup>3</sup> Dispersive Liquid-Liquid Microextraction

<sup>5</sup> Sulfadiazine

<sup>6</sup> Sulfamethoxazole

<sup>2</sup> Dispersive Solid Phase Extraction

<sup>4</sup> Air assisted Liquid-Liquid Microextraction

<sup>7</sup> Sulfamethazine <sup>8</sup> Diode Array Detector

## مواد و روش‌ها

## - مواد شیمیایی و نمونه‌های حقیقی

سولفات روی، اکتا دسیل سیلان (ODS)، PSA<sup>1</sup> و کربن فعال گرافیتی یا GCB<sup>2</sup>، سدیم کلرید، اکتانول، دکانول و n-هگزانول با درجه خلوص تجزیه‌ای از شرکت مرک (Merck, Germany) و استاندارد آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی از شرکت سیگما (Sigma, USA) تهیه شد. برای سنجش کاربرد روش توسعه یافته در استخراج آنتی‌بیوتیک‌های هدف از نمونه‌های شیر نیز تعداد ۱۰ نمونه شیر پاستوریزه در بهار سال ۱۴۰۲ به صورت تصادفی از محل‌های عرضه در شهر تبریز تهیه و در آزمایشگاه مرکز ایمنی غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت شرایط بهینه‌شده استخراج و آنالیز شدند. به منظور کنترل کیفی سیستم کروماتوگرافی، محلول استاندارد آنتی‌بیوتیک‌ها (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) هر روز سه بار به دستگاه HPLC (Agilent Technologies, Model 1200, DAD system, USA) تزریق و فاکتور تغلیظ و راندمان استخراج مورد ارزیابی قرار گرفت.

## - روش استخراج

آماده‌سازی و استخراج باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی از نمونه‌های شیر در این مطالعه بر پایه تلفیق روش استخراج فاز جامد پخشی و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی کمک‌شده با هوا صورت گرفته است. برای این منظور، ابتدا ۵ میلی‌لیتر از نمونه شیر برداشته شده و با حجم ۳ میلی‌لیتر از محلول سولفات روی ۲۰ درصد وزنی/حجمی (به عنوان عامل رسوب دهنده) در داخل یک لوله آزمایش مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ، فاز رویی برداشته شده و در یک لوله‌ی آزمایش دیگر ۳۰ میلی‌گرم از اکتا دسیل سیلان (ODS) روی آن اضافه شده و مخلوط به مدت سه دقیقه ورتکس گردید. پس از سانتریفیوژ، جاذب از محلول جدا شده و فاز رویی دور ریخته شد. در مرحله بعد، آنالیت‌های جذب شده به روی جاذب تحت امواج التراسونیک و با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر n-هگزانول در مدت زمان دو دقیقه واجذب شد. فاز آلی بدست آمده برداشته شده و چند بار به سرعت به داخل پنج میلی‌لیتر آب دیونیزه تزریق و

مجدداً به داخل سرنگ کشیده شد تا محلول ابری تشکیل گردد. پس از سانتریفیوژ محلول حاصل، فاز آلی روئی برداشته شده و به سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق گردید. برای دستیابی به حداکثر تفکیک در سیستم کروماتوگرافی، شرایط کارکرد HPLC-DAD برای جداسازی آنتی‌بیوتیک‌ها مطابق جدول ۱ انتخاب شد.

## جدول ۱- شرایط کارکرد HPLC-DAD به منظور آنالیز

## آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدی در نمونه‌های شیر

Table 1- Optimized condition of the HPLC-DAD for analysis of sulfonamides in milk samples

Column	Zorbax SB-Aq C18 column, L=15 cm, ID= 4.6 mm, Particle size= 5 μm
Mobile phase	A gradient elution composed of 0.01 M phosphate buffer pH 5.0: acetonitrile (82:18 (v/v)), 0.7 ml/min
Injector	Temperature: 40 °C, Loop= 10 μL
Detection wavelength	256 nm

## - بهینه‌سازی شرایط استخراج

برای این منظور مقدار عامل رسوب‌دهنده یعنی سولفات روی از بین مقادیر ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد وزنی/حجمی انتخاب شد. همچنین عوامل موثر در مرحله استخراج فاز جامد پخشی مانند نوع جاذب (از بین اکتا دسیل سیلان، PSA و کربن فعال)، مقدار جاذب (از بین مقادیر ۵ تا ۵۰ میلی‌گرم)، مدت زمان‌های یک تا ۵ دقیقه ورتکس کردن نمونه‌ها و اثر pH (در مقادیر ۲ تا ۸) بهینه‌سازی گردید. عوامل موثر در مرحله استخراج مایع-مایع پخشی شامل نوع و حجم حلال واجذبی (با اضافه کردن ۱۰۰ تا ۲۵۰ میکرولیتر از سه حلال آلی سبک‌تر از آب یعنی اکتانول، دکانول و n-هگزانول)، اثر نمک‌زنی (با افزودن مقادیر متفاوتی از نمک در محدوده صفر تا ۸ درصد وزنی/حجمی) و یک تا چهار دقیقه اولتراسوند کردن نمونه‌ها برای حداکثر واجذبی آنالیت‌ها نیز بررسی و بهترین حالت انتخاب گردید. برای بررسی عوامل موثر در روش توسعه داده‌شده از روش "یک پارامتر در یک زمان" استفاده و تاثیر این عوامل با مقایسه سطح زیر پیک حاصل از آنالیت‌ها در شرایط مختلف بررسی شد (Chandran & Singh, 2007).

<sup>1</sup> Primary Secondary Amine<sup>2</sup> Graphitized carbon black

توسعه روش استخراج فاز جامد پخشی برای اندازه‌گیری باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها

بیشتری در استخراج آنتی‌بیوتیک‌های هدف دارد و از این رو این ترکیب به عنوان مناسب‌ترین جاذب انتخاب گردید. همچنین بهترین نتیجه استخراج در به‌کارگیری ۳۰ میلی‌گرم از جاذب مذکور حاصل شد (شکل ۲).

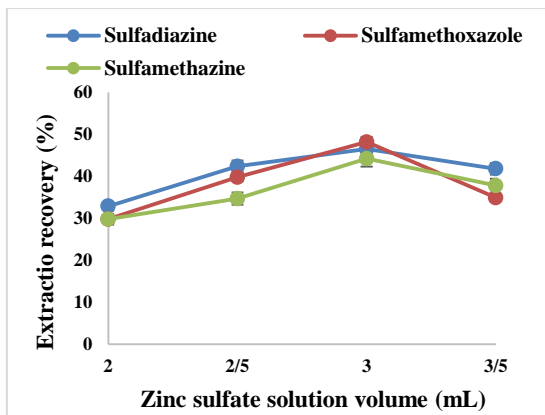
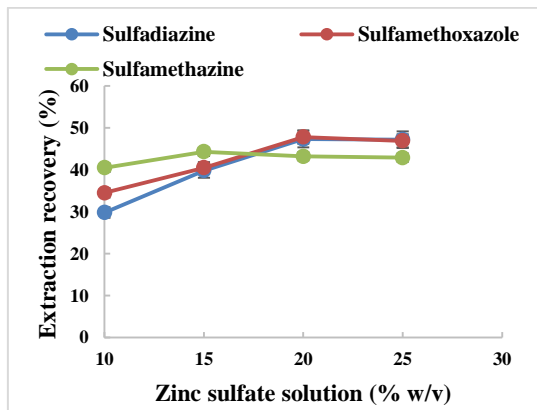


Figure 1- Selecting the zinc sulfate concentration for precipitation of milk proteins in the extraction of sulfonamide residues from milk samples

شکل ۱- انتخاب غلظت سولفات روی برای رسوب پروتئین‌های شیر در استخراج باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدی از نمونه‌های شیر

#### – اثر pH

برای بررسی اثر این پارامتر، pH محلول‌های آزمایشی از ۲ تا ۸ تنظیم شد که بالاترین مقدار بازیابی آنالیت‌ها در محدوده خنثی بدست آمد (شکل ۲) لذا ادامه آزمایشات در pH نرمال محلول‌های آزمایشی انجام شد.

#### – مدت زمان هم‌زدن نمونه

در این مطالعه برای تماس هر چه بیشتر نمونه با جاذب از

#### – اعتبارسنجی

پس از ترسیم نمودار معیارگیری یا منحنی کالیبراسیون (با آنالیز محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدی)، مشخصات تجزیه‌ای روش به‌کار رفته، شامل تعیین محدوده خطی یا LR<sup>۱</sup>، حد تشخیص یا LOD<sup>۲</sup>، حد اندازه‌گیری یا LOQ<sup>۳</sup>، تکرارپذیری در یک روز و در بین روزها براساس انحراف استاندارد نسبی یا RSD%<sup>۴</sup> و راندمان استخراج یا ER<sup>۵</sup> محاسبه شدند (González & Herrador 2007).

#### – بررسی اثر بافت نمونه در استخراج

ماتریکس نمونه‌های شیر می‌تواند در اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌ها تداخل ایجاد نماید، لذا استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از سه نمونه شیر (اسپایک شده با مقادیر ۲ و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از هر کدام از آنالیت‌ها) انجام و مقادیر آنالیت‌ها با روش پیشنهادی یافت شد. مقادیر بازیابی نسبی محاسبه و اثر ماتریکس ارزیابی شد.

همچنین برای بررسی قابلیت روش توسعه داده شده در اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌ها، اقدام به اندازه‌گیری آنالیت‌ها در ۱۰ نمونه‌ی مختلف شیر شد. نمونه‌های شیر طبق شرایط بهینه با روش پیشنهادی تغلیظ و آماده‌سازی شدند و سپس با HPLC-DAD مورد آنالیز قرار گرفتند.

#### یافته‌ها

#### – انتخاب غلظت و حجم ماده رسوب دهنده پروتئین شیر

نتایج این آزمون نشان داد که بالاترین درصد بازیابی آنالیت‌ها در استفاده از مقدار ۳ میلی‌لیتر سولفات روی ۲۰ درصد حاصل شد (شکل ۱) که در ادامه مطالعه نیز از این مقدار سولفات روی برای رسوب پروتئین‌های شیر استفاده گردید.

#### – نتایج بهینه‌سازی مرحله استخراج فاز جامد پخشی

#### – نوع و مقدار جاذب

همان‌طوریکه در شکل ۲ نشان داده شده است، در بین مواد جاذب تجاری استفاده شده، اکتا دسیل سیلان قابلیت

<sup>1</sup> Linear range      <sup>2</sup> Limit of Detection  
<sup>5</sup> Extraction Recovery

<sup>3</sup> Limit of Quantitation      <sup>4</sup> Relative Standard Deviation

نتایج نشان داد که افزایش حجم این حلال در مقادیر بالاتر از ۱۰۰ میکرولیتر تاثیر مثبتی در افزایش کارایی استخراج نداشت لذا آزمایشات با حجم ۱۰۰ میکرولیتر از n-هگزانول ادامه یافت (شکل ۳). لازم به توضیح است در مقادیر کمتر از این مقدار، حجم فاز جمع شده پس از سانتریفیوژ جهت تزریق به HPLC کافی نبود.

#### اثر نمک‌زنی

در مرحله استخراج مایع مایع پخشی برای بررسی اثر نیروی یونی بر روی کارایی استخراج، مقادیر مختلفی از کلرید سدیم به داخل نمونه آبی به دست آمده از مرحله استخراج فاز جامد پخشی اضافه و روش پیشنهادی ادامه یافت. مطابق شکل ۳، افزایش نمک سبب کاهش کارایی روش پیشنهادی گردید. لذا کلیه آزمون‌ها بدون افزودن نمک انجام شد.

ورتکس کردن نمونه و جاذب استفاده گردید و مشاهده شد (شکل ۲) که با افزایش مدت زمان هم زدن تا ۳ دقیقه، راندمان استخراج آنالیت‌ها افزایش و بعد از آن تقریباً ثابت می‌ماند.

#### نتایج بهینه‌سازی مرحله استخراج مایع - مایع پخشی

##### نوع و حجم حلال واجذبی

نوع حلال واجذبی، از بین حلال‌های سبکتر از آب و با قابلیت انحلال نسبتاً کم انتخاب شد. حلال‌های سبکتر از آب دارای سمیت کمتری نسبت به حلال‌های آلی سنگین‌تر از آب می‌باشند همچنین به دلیل حلالیت کم آن‌ها، امکان تغلیظ بیشتر در مرحله میکرواستخراج مایع - مایع پخشی کمک شده با هوا فراهم می‌شود. در بین حلال‌های مورد بررسی، راندمان استخراج با n-هگزانول بیشتر بوده و این حلال برای مراحل بعدی انتخاب شد (شکل ۳). همچنین

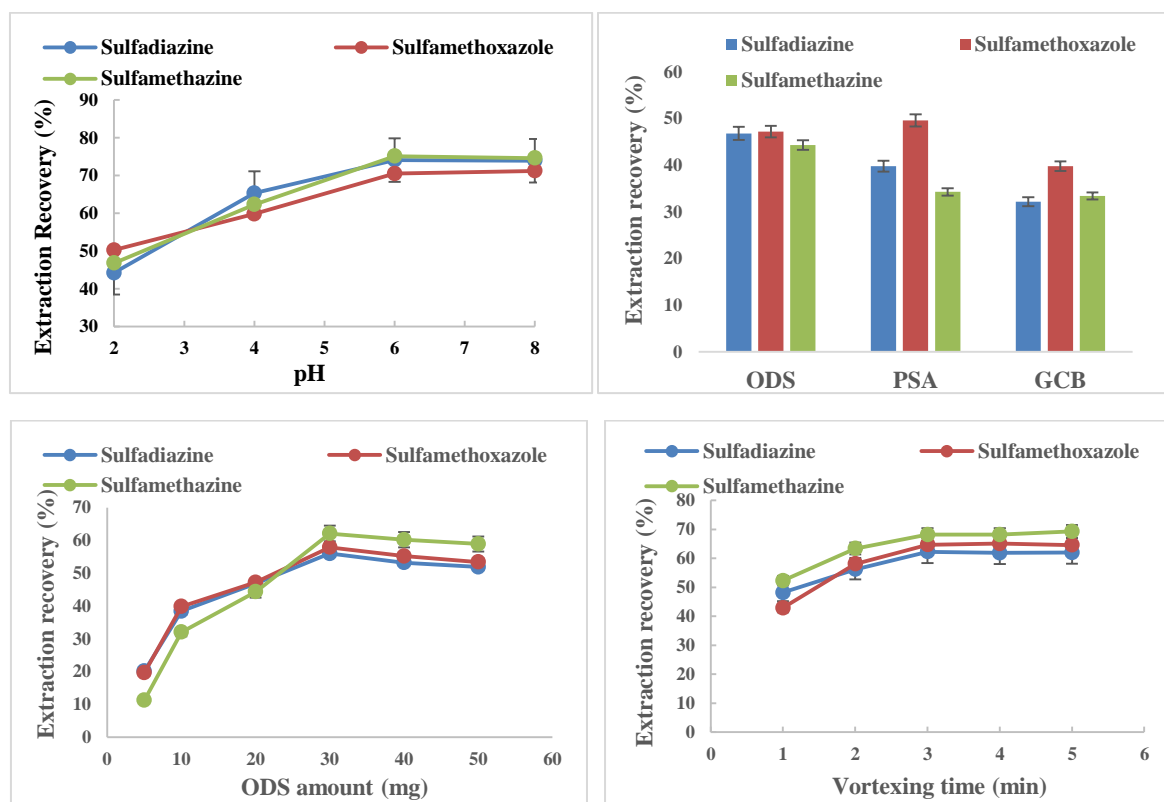


Figure 2- Selecting the absorbent type (A), absorbent amount (B), pH effect and vortexing time (C) in DSPE stage for the extraction of sulfonamide residues from milk samples

شکل ۲- انتخاب نوع جاذب (A)، مقدار جاذب (B)، اثر pH و زمان ورتکس کردن (C) در مرحله استخراج فاز جامد پخشی برای استخراج باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدی از نمونه‌های شیر

توسعه روش استخراج فاز جامد پخشی برای اندازه‌گیری باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها

۳ و ۱۰ می‌باشد در نظر گرفته شد. تکرارپذیری آزمون‌ها نیز با استفاده از انحراف استاندارد نسبی (RSD %) حاصل شد و نشان دهنده دقت بالای روش ارائه شده در اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌های هدف بود. نتایج اعتبارسنجی روش پیشنهادی در جدول ۲ ارائه شده است.

#### – اثر بافت شیر در استخراج و صحت روش

مقایسه سیگنال‌های تجزیه‌ای بدست آمده برای تعداد سه نمونه شیر با شیوه افزایش استاندارد مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور نمونه‌های شیر با آنالیت‌های مورد مطالعه اسپایک شده و سپس مقدار آن‌ها با روش پیشنهادی اندازه گرفته شد. مقادیر بازیابی نسبی با تقسیم مقادیر یافت شده به مقادیر اسپایک شده، محاسبه و گزارش گردید. نتایج حاصل در جدول ۳، نشان می‌دهد که ماتریکس نمونه‌های شیر تأثیر محسوسی در کارایی روش پیشنهادی ندارد.

#### – مدت زمان واجذب نمونه

همانگونه که در شکل ۳ دیده می‌شود، بالاترین بازده استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها و واجذب آن‌ها از ذرات جاذب به حلال استخراج کننده در مدت زمان یک دقیقه (همراه با اولتراسوند کردن نمونه‌ها) ثبت گردید.

#### – مشخصات تجزیه‌ای روش پیشنهادی

پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر تحت شرایط بهینه محاسبه شدند. منحنی‌های کالیبراسیون با اسپایک کردن هفت غلظت از آنالیت‌های مورد مطالعه (مقادیر ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر نسبت به هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه) پس از اجرای روش توسعه یافته رسم شد و محدوده خطی برای هر یک از آنالیت‌ها بدست آمد. حد تشخیص و حد اندازه‌گیری روش به ترتیب برابر غلظت‌هایی که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز به ترتیب

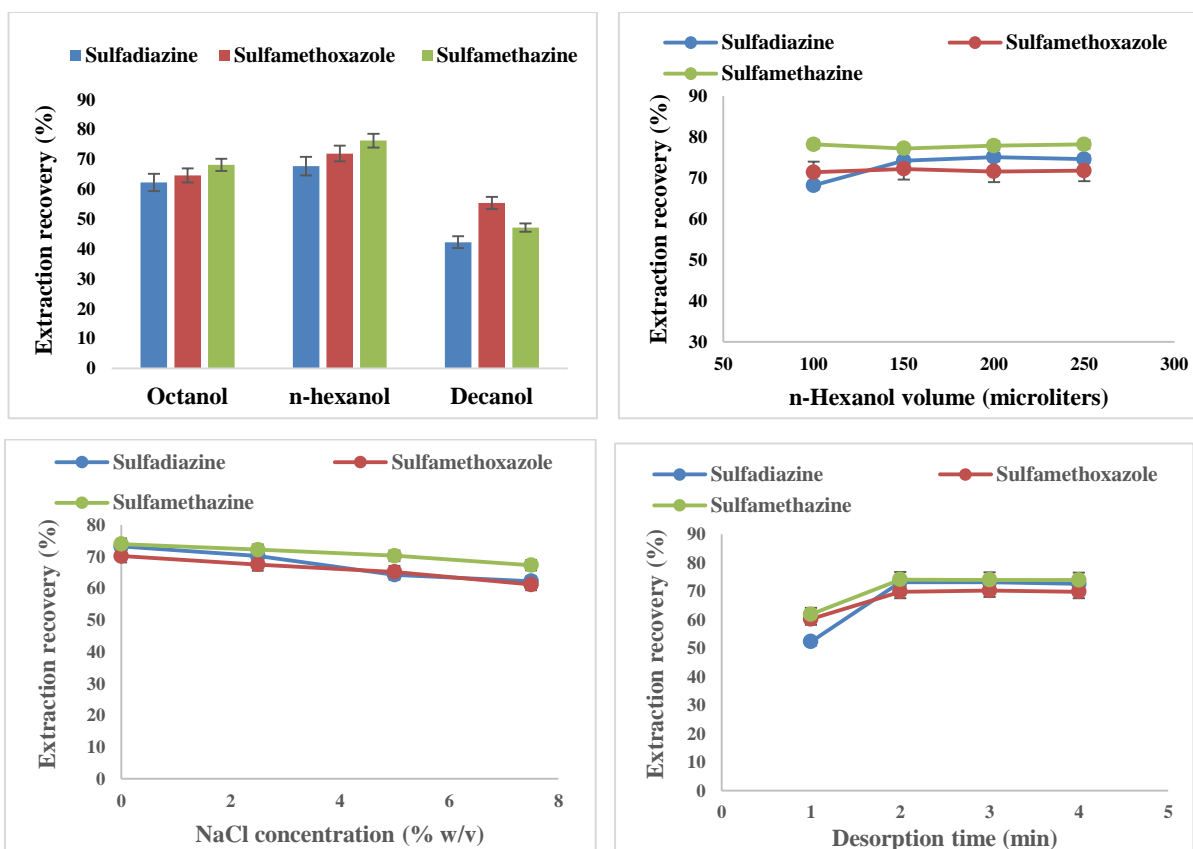


Figure 3- Selecting the solvent type (A), solvent volume (B) salting effect (C) and desorption time in DLLME stage for the extraction of sulfonamide residues from milk samples

شکل ۳- انتخاب نوع حلال (A)، حجم حلال (B)، اثر نم‌زنی (C) و مدت زمان واجذب در مرحله میکرواستخراج مایع مایع پخشی برای استخراج باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدی از نمونه‌های شیر

جدول ۲- ارقام شایستگی روش توسعه داده شده برای استخراج آنتی بیوتیک‌های سولفونامیدی از نمونه‌های شیر

Table 2- Quantitative features of the developed method for sulfonamides extraction from milk samples

Analyte	LR <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup>	LOQ <sup>c</sup>	r <sup>2d</sup>	precision (RSD%) <sup>e</sup>		ER ± SD <sup>f</sup>
					Intra-day	Inter-day	
Sulfadiazine	2.2-250	0.6	2.2	0.996	4.2	5.4	73 ± 4
Sulfamethoxazole	3.2-250	1.1	3.2	0.998	3.9	6.1	70 ± 2
Sulfamethazine	1.6-250	0.48	1.6	0.995	2.6	5.3	74 ± 2

a) Linear range (ng ml<sup>-1</sup>)

b) Limit of detection (S/N = 3) (ng ml<sup>-1</sup>)

c) Limit of quantification (S/N = 10) (ng ml<sup>-1</sup>)

d) Coefficient of determination

e) Relative standard deviation (n = 6)

f) Extraction recovery ± standard deviation (n = 3)

جدول ۳- نتایج بررسی اثر ماتریکس شیر در استخراج آنتی بیوتیک‌های سولفونامیدی

Table 3- Results of assays to check the milk sample matrix effect on sulfonamides extraction

Analyte	Mean relative recovery ± standard deviation (n = 3)		
	Sample1	Sample2	Sample3
All samples were spiked with each analyte at a concentration of 5 ng ml <sup>-1</sup>			
Sulfadiazine	92 ± 2	94 ± 4	93 ± 2
Sulfamethoxazole	90 ± 5	93 ± 3	92 ± 2
Sulfamethazine	93 ± 4	95 ± 3	95 ± 6
All samples were spiked with each analyte at a concentration of 50 ng ml <sup>-1</sup>			
Sulfadiazine	95 ± 2	100 ± 4	96 ± 5
Sulfamethoxazole	98 ± 3	89 ± 4	91 ± 1
Sulfamethazine	101 ± 4	96 ± 5	93 ± 6

پروتئین را به هم چسبانده و حلالیت آنها را در نمونه آبی کاهش می‌دهند (Ghasemi *et al.*, 2022). مقدار کم این ترکیب قادر به رسوب‌دهی کامل پروتئین‌ها نخواهد بود، ضمن اینکه مقدار زیاد آن نیز می‌تواند سبب تغییر ماهیت نمونه شود (Jadhav & Badgujar, 2021) لذا بهینه‌سازی مقدار ماده رسوب دهنده لازم است.

در تحقیق حاضر از یک ماده جامد برای استخراج آنتی بیوتیک‌ها از نمونه‌های شیر استفاده شد. ضمن اینکه ماده جاذب باید از قدرت جذب بالایی برخوردار باشد، ابعاد و دانه‌بندی آن نیز باید منظم باشد تا بتواند به‌طور یکنواخت در داخل محلول حاوی آنالیت‌ها پخش شود. از طرفی این جاذب باید قابلیت جدا شدن از نمونه شیر طی فرایند سانتریفیوژ را داشته باشد (Mohebbi *et al.*, 2018). با در نظر گرفتن این شرایط سه جاذب اکتا دسیل سیلان، PSA و کربن فعال شده به‌عنوان جاذب استخراج‌کننده انتخاب شدند. مقدار جاذب نیز جزو پارامترهای موثر در کارایی مرحله اول استخراج می‌باشد. این تاثیر به نسبت فاز جامد و حجم محلول نمونه ارتباط دارد یعنی در مقادیر کم جاذب، نسبت فازها کم بوده و راندمان استخراج پایین است و برعکس، با افزایش مقدار جاذب نسبت فازها افزایش یافته

همچنین برای بررسی صحت روش آنالیز آنتی بیوتیک‌های سولفونامیدی هدف، مقدار آن‌ها در ۱۰ نمونه شیر تحت شرایط بهینه اندازه‌گیری شد. مقایسه کروماتوگرام‌های حاصل از نمونه‌های حقیقی و نمونه استاندارد نشان دهنده وجود سولفامتوکسازول در سه نمونه شیر در مقادیر ۱/۱۳ ± ۰، ۲/۹ ± ۰ و ۵/۹ ± ۰ نانوگرم در میلی‌لیتر بود که همگی کمتر از حد مجاز باقیمانده تعیین شده (۱۰۰ ppb) در نمونه شیر بودند (Regulation 2377/90/EC). سایر آنتی بیوتیک‌ها در نمونه‌های مورد مطالعه یافت نشد. شکل ۴، کروماتوگرام‌های HPLC-DAD مربوط به تزریق مستقیم استاندارد آنالیت‌های مورد مطالعه و یک نمونه‌ی شیر اسپایک نشده را نشان می‌دهد.

### بحث

به کار بردن عوامل رسوب‌دهنده برای حذف مزاحمت موادی مانند پروتئین‌ها و استخراج بهتر آنالیت‌های فاز آبی شیر از جمله آنتی بیوتیک‌ها ضروری است و یکی از روش‌های متداول این کار در نمونه‌های شیر استفاده از سولفات روی است. کاتیون‌های روی مانند پل‌های عرضی مولکول‌های

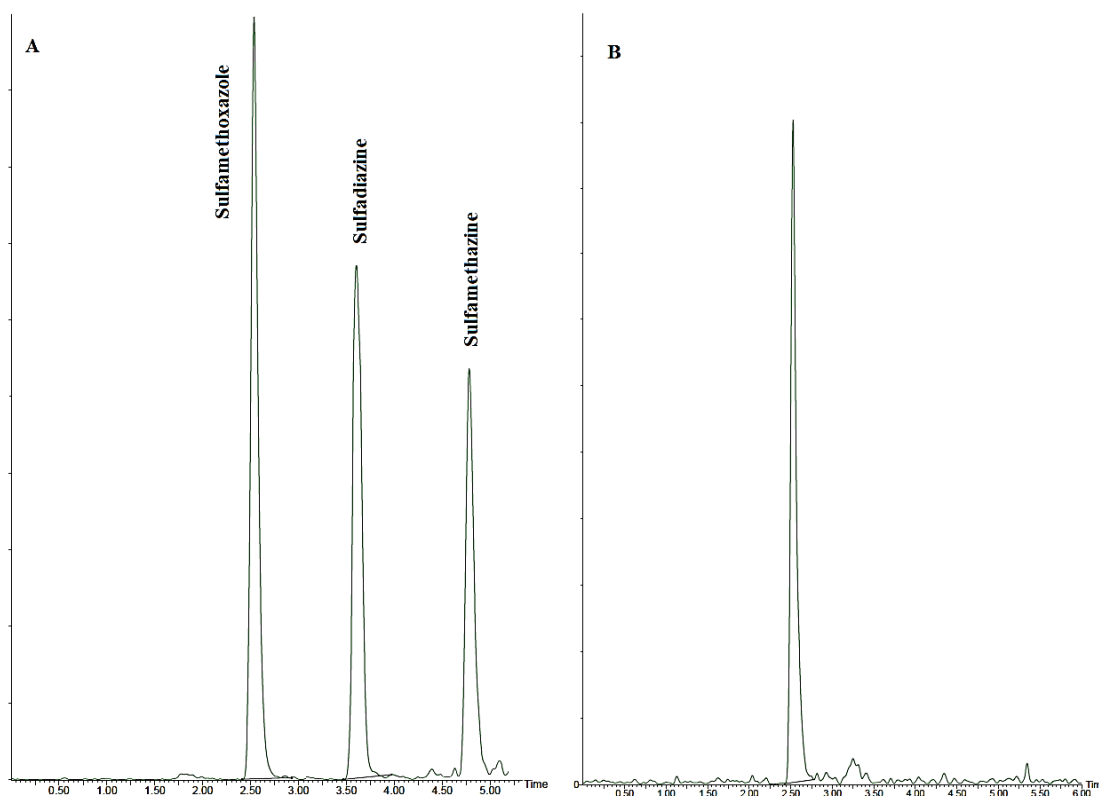


Figure 4- Typical HPLC-DAD chromatograms of direct injection of standard solution of the target antibiotics at a concentration of  $5 \text{ mg L}^{-1}$  (A) and un-spiked milk sample (B) after performing the suggested method.

شکل ۴- کروماتوگرام HPLC-DAD حاصل از (A) تزریق مستقیم محلول استاندارد آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر و (B) نمونه شیر اسپایک نشده، پس از اجرای روش پیشنهادی.

۱۲

(Mogaddam, 2012). چون حجم این حلال بازده استخراج و تکرارپذیری نتایج را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد از دیگر پارامترهایی است که نیاز به ارزیابی و بهینه‌سازی دارد. به‌عبارت دیگر، حجم بالای حلال موجب افزایش حجم فاز جمع‌شده نهایی، کاهش فاکتور تغلیظ و کاهش سیگنال‌های تجزیه‌ای می‌شود. همچنین کاهش حجم حلال نیز باعث کاهش کارایی استخراج و تکرارپذیری می‌گردد لذا حجم حلال استخراج‌کننده باید بهینه‌سازی شود (Gholizadeh *et al.*, 2022).

ایجاد قدرت یونی محلول آزمایشی با افزودن کلرید سدیم ممکن است دو اثر متقابل داشته باشد یعنی هم می‌تواند سبب کاهش میزان دسترسی مولکول‌های آنالیت به آب و بنابراین انتقال آن‌ها به داخل حلال استخراج‌کننده شده و سبب افزایش کارایی روش شود و هم ممکن است حل شدن حلال در فازآبی را کاهش داده و منجر به افزایش حجم فاز آلی جمع‌شده گردیده و باعث کاهش

و راندمان استخراج افزایش می‌یابد (Rasi *et al.*, 2021) لذا مقدار جاذب هم باید بهینه شود.

انتخاب حلال استخراج‌کننده مناسب یکی از پارامترهای مهم در اجرای روش میکرو استخراج مایع پخشی می‌باشد. در این روش حلال استخراج‌کننده باید آنالیت‌ها را از ذرات جامد واجذب نموده و در فاز مایع پخش کند. از این رو حلال مورد استفاده باید حلالیت کمی در فاز آبی داشته و قابلیت پخش شدن در آن را داشته باشد. از طرف دیگر این حلال باید دارای دانسیته متفاوت از آب باشد تا جمع‌آوری آن با سانتریفیوژ ممکن باشد (Meshkini *et al.*, 2021). در این مطالعه از حلال‌های سبک تر از آب برای این منظور استفاده گردید. مزیت عمده روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی کمک شده با هوا در حذف حلال پخش‌کننده آنالیت در فاز آبی است و این کار با چند بار دمیده شدن و مکیده شدن سریع حلال استخراج‌کننده بداخل سرنگ انجام می‌شود (Farajzadeh &



راندمان استخراج شود (Llompart *et al.*, 2019). در تحقیق حاضر بالاترین کارایی استخراج آنتی‌بیوتیک‌های هدف در مدت زمان دو دقیقه میکروویو کردن نمونه‌ها حاصل گردید.

به‌منظور ارزیابی کارایی روش پیشنهادی در استخراج آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدی، برخی پارامترهای تجزیه‌ای روش توسعه داده شده با چند روش به‌کار رفته برای استخراج این آنالیت‌ها از نمونه‌های شیر مقایسه شد. این بررسی نشان داد مقادیر شایستگی روش ارائه شده در استخراج آنتی‌بیوتیک‌های هدف قابل قبول و در مواردی حتی بهتر از مقادیر به‌دست آمده با روش‌های حساس‌تری مانند به‌کارگیری آشکارساز اسپکترومتر جرمی می‌باشد (جدول ۳).

سیگنال تجزیه‌ای در اثر رقیق شدن نمونه شود (Zare Sani *et al.*, 2021). در این کار پژوهشی کاهش کارایی روش با افزودن کلرید سدیم در انتخاب شرایط بهینه استخراج به اثبات رسید که مطالعه بدون افزودن نمک ادامه یافت.

یکی دیگر از عواملی که موجب تسریع فرایند استخراج می‌شود افزایش تحرکات مولکولی و ضرایب توزیع آنالیت‌ها می‌باشد. این ویژگی که معمولاً به کمک ورتکس کردن (Amini *et al.*, 2018) یا اولتراسوند نمودن (Farajpour *et al.*, 2023) نمونه عملی می‌گردد سبب افزایش دمای محلول آزمایشی و بالا رفتن سرعت واکنش‌ها نیز می‌شود. از طرف دیگر افزایش مدت زمان هم زدن نمونه می‌تواند سبب تخریب ترکیبات هدف موثر شده و منجر به کاهش

### جدول ۳- مقایسه روش حاضر با سایر روش‌های منتشر شده برای تعیین آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدی در نمونه شیر

Table 3- Comparison of the current method with other published methods for the determination of sulfonamides in milk sample

Analyte	LOD	LOQ	RSD (%)	ER (%)	Method	References
Sulfadiazine	3	4	10	105	LLE-HPLC-MS/MS	(Nebot <i>et al.</i> , 2013)
Sulfamethoxazole	1	1	5	82		
Sulfamethazine	2	4	10	96		
Sulfadiazine	-	12.5	4.9	89	SPE-LC/MS	(Cavaliere <i>et al.</i> , 2003)
Sulfamethoxazole	-	35	5.3	97		
Sulfamethazine	-	25	9.1	102		
Sulfadiazine	0.89	2.97	3.74	97.4	MIL-DLLME- HPLC/ UV	(Yao & Du, 2020)
Sulfamethazine	0.60	2.03	4.17	98.2		
Sulfamethazine	2	6	7	96	MSPE-HPLC/AD	(Tolmacheva <i>et al.</i> , 2016)
Sulfamethoxazole	2	6	8	98		
Sulfadiazine	0.6	2.2	4.2	73	DSPE-ALLME-HPLC/DAD	This method
Sulfamethoxazole	1.1	3.2	3.9	70		
Sulfamethazine	0.48	1.6	2.6	74		

Abbreviations:

LOD: Limit of detection ( $\text{ng ml}^{-1}$ )

LOQ: Limit of quantification ( $\text{ng ml}^{-1}$ )

RSD: Relative standard deviation

ER: Extraction recovery

LLE-HPLC-MS/MS: liquid liquid extraction coupled to high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

SPE-LC/MS: solid phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry.

MIL-DLLME- HPLC/ UV-vis: magnetic ionic based dispersive liquid liquid microextraction coupled to high performance liquid chromatography ultraviolet detector.

MSPE-HPLC/AD: magnetic solid phase extraction coupled to high performance liquid chromatography tandem amperometric detection.

DSPE-ALLME-HPLC/DAD: combination of dispersive solid phase extraction and air-assisted liquid liquid microextraction coupled to high performance liquid chromatography tandem diode array detector.

for the Extraction of Bisphenol A and Bisphenol B in Canned Doogh Samples. *Food Analytical Methods*, 11(11), 3267-3275. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1260-8>

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D. & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>

Anon. European Commission, Council Regulation 2377/90/EC. Procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, pp. 1-8.

Cavaliere, C., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M. & Samperi, R. (2003). A simple and sensitive liquid chromatography– mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and egg. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(3), 558-566. <https://doi.org/10.1021/jf020834w>

Chandran, S. & Singh, R. (2007). Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(1), 4-14. <https://doi.org/10.1691/ph2007.1.5064>

Farajpour, S., Afshar Mogaddam, M. & Khandaghi, J. (2023). Combination of QuEChERS Dispersive Liquid-Liquid Microextraction based on Magnetic Ionic Liquids for extraction of Carbamate Pesticides from Apple Samples prior to their analysis by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 20. <https://doi.org/10.30495/JFTN.2023.72129.11241> [In Persian].

Farajzadeh, M. A. & Afshar Mogaddam, M. (2012). Air-assisted liquid-liquid microextraction method as a novel microextraction technique; Application in extraction and preconcentration of phthalate esters in aqueous sample followed by gas chromatography–flame ionization detection. *Analytica Chimica Acta*, 728, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115734>

Ghasemi, R., Mirzaei, H., Afshar Mogaddam, M., Khandaghi, J. & Javadi, A. (2022). Application of magnetic ionic liquid-based air-assisted liquid-liquid

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه تلفیق دو روش استخراج فاز جامد پخشی و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی کمک شده با هوا برای آماده سازی و پیش‌تغلیظ آنتی‌بیوتیک‌های سولفادiazین، سولفامتازین و سولفامتوکسازول از نمونه‌های شیر توسعه داده شده و سپس اندازه‌گیری کمی آن‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز آرای دیودی انجام شد. خطی بودن روش پیشنهادی (ضریب تعیین بالاتر از ۰/۹۹۵) در محدوده ۳/۲ تا ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و حد تشخیص پایین در محدوده ۰/۴۸-۱/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر (کمتر از حد مجاز قابل قبول برای باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های هدف در شیر) تکرارپذیری روش در محدوده ۲/۶ تا ۶/۱ و بازده استخراج بالاتر از ۷۰ درصد، تایید می‌کند که این روش دقیق و قابل اعتماد بوده و از کارایی بالایی در تجزیه و تعیین آنالیت‌های هدف در نمونه شیر برخوردار است. به‌علاوه اجرای روش مذکور بر روی نمونه‌های شیر وجود سولفامتوکسازول در سه نمونه شیر را نشان داد که کمتر از حد مجاز تعیین شده برای باقیمانده این آنتی‌بیوتیک در شیر بود.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا به این وسیله از همکاری آزمایشگاه کنترل غذا و داروی مرکز تحقیقات ایمنی غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در انجام این پژوهش صمیمانه قدردانی نمایند.

## منابع

Afshar Mogaddam, M., Khandaghi, J. & Vajdi HokmAbad, S. (2023). Use of Temperature-controlled Ionic Liquid-assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Detection of Amoxicillin, Cloxacillin and Erythromycin Residues in Cow Milk using High Performance Liquid Chromatography. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 18(1), 119-126. <https://doi.org/20.1001.1.17357756.1402.18.1.10.7> [In Persian].

Amini, R., Khandaghi, J. & Afshar Mogaddam, M. (2018). Combination of Vortex-Assisted Liquid-Liquid Extraction and Air-Assisted Liquid-Liquid Microextraction

microextraction followed by back-extraction optimized with centroid composite design for the extraction of antibiotics from milk samples prior to their determination by HPLC–DAD. *Microchemical Journal*, 181, 107764. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107764>

Gholizadeh, S., Mirzaei, H., Khandaghi, J., Afshar Mogaddam, M. & Javadi, A. (2022). Ultrasound–assisted solvent extraction combined with magnetic ionic liquid based–dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of mycotoxins from tea samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 114, 104831. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104831>

González, A. G. & Herrador, M. Á. (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(3), 227-238. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>

Jadhav, V. J. & Badgujar, P. C. (2021). Development of a HPLC fluorescence method for determining efficacy of milk pasteurization. *Food Analytical Methods*, 14(2), 260-267. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01865-6>

Jayalakshmi, K., Paramasivam, M., Sasikala, M., Tamilam, T. & Sumithra, A. (2017). Review on antibiotic residues in animal products and its impact on environments and human health. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 1446-1451. <https://doi.org/>

Jeddy, M. & Khandaghi, J. (2019). Detection and quantification of phytosterols in yogurt using gas chromatography. *Food Hygiene*, 9(1 (33)), 59-70. <https://doi.org/10.30495/JFH.2019.545850> [In Persian].

Limoei Khosrowshahi, B., Marzi Khosrowshahi, E., Afshar Mogaddam, M. & KHandaghi, J. (2022). Use of Dispersive Solid-Phase Extraction in Combination with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Assessment of Organophosphorus Pesticides in Fruit Juice Samples Using Gas Chromatography-Nitrogen-Phosphorus Detector. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 87-98. <https://doi.org/20.1001.1.17357756.1401.17.2.8.0> [In Persian].

Llompарт, M., Celeiro, M. & Dagnac, T. (2019). Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products and industrial contaminants in the environment.

*TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 136-150.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.029>

Meshkini, K., AfsharMogaddam, M. & Khandaghi, J. (2021). Development of Homogeneous Liquid-Liquid Extraction in Combination with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Deep Eutectic Solvents for the Extraction and Assessment of Phytosterols in Animal Cream Samples using Gas Chromatography Equipped with Flame Ionization Detector. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 16(2), 57-67. <https://doi.org/10.52547/nsft.16.2.57> [In Persian].

Mirzaei, H., Afshar Mogaddam, M. & Khandaghi, J. (2022). Simultaneous determination of four biogenic amines in whey samples using a new solid phase extraction method prior to their analysis by HPLC-MS/MS. *Microchemical Journal*, 177, 107313. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107313>

Mohebbi, A., Yaripour, S., Farajzadeh, M. A. & Afshar Mogaddam, M. (2018). Combination of dispersive solid phase extraction and deep eutectic solvent–based air–assisted liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry as an efficient analytical method for the quantification of some tricyclic antidepressant drugs in biological fluids. *Journal of Chromatography A*, 1571, 84-93. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.022>

Nebot, C., Regal, P., Miranda, J. M., Fente, C. & Cepeda, A. (2013). Rapid method for quantification of nine sulfonamides in bovine milk using HPLC/MS/MS and without using SPE. *Food Chemistry*, 141(3), 2294-2299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.099>

Rasi, H., AfsharMogaddam, M. & Khandaghi, J. (2021). Application of a new extraction method coupled to high performance liquid chromatography for tetracyclines monitoring in cow milk. *Journal of food science and technology (Iran)*, 18(113), 339-349. <https://doi.org/10.52547/fsct.18.113.339> [In Persian].

Sachi, S., Ferdous, J., Sikder, M. H. & Hussani, S. A. K. (2019). Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 6(3), 315. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f350>

Tolmacheva, V. V., Apyari, V. V., Furlotov, A. A., Dmitrienko, S. G. & Zolotov, Y. A. (2016). Facile synthesis of magnetic hypercrosslinked polystyrene and its application in the magnetic solid-phase extraction of sulfonamides from water and milk samples before their HPLC determination. *Talanta*, 152, 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.010>

Yao, T. & Du, K. (2020). Simultaneous determination of sulfonamides in milk: In-situ magnetic ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC. *Food chemistry*, 331, 127342. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127342>

Zare Sani, M., Afshar Mogaddam, M. & Khandaghi, J. (2021). Combination of cold

induced HLLME with an effervescence-assisted DLLME based on deep eutectic solvent decomposition; application in extraction of some pyrethroid and carbamate pesticides from edible oils. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-16. <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1955110>

Zejadi, S., Afshar Mogaddam, M., Farajzadeh, M. A. & Khandaghi, J. (2020). Combination of dispersive solid phase extraction with lighter than water dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of organophosphorous pesticides from milk. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-14. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1804892>

# Development of Dispersive Solid-phase Extraction Combined with Air-assisted Liquid-Liquid Microextraction for Determination of Sulfonamide Residues in Pasteurized Milk Samples using High Performance Liquid Chromatography

M. Tajallaei <sup>a</sup>, A. Haghghat <sup>b</sup>, M. R. Afshar Mogaddam <sup>c</sup>, J. Khandaghi <sup>d\*</sup>

<sup>a</sup> M. Sc. Graduated of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.

<sup>b</sup> Instructor of the Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.

<sup>c</sup> Assistant Professor of Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran and Assistant Professor of Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

<sup>d</sup> Assistant Professor of the Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran and Assistant Professor of Department of Food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Received: 2 August 2023

Accepted: 21 December 2023

## Abstract

**Introduction:** One of the significant contaminants in animal-derived foods, such as milk, is antibiotic residues, which put consumers' health at risk. Monitoring the amount of antibiotic residue in milk is crucial in order to alert the nation's health authorities and in this regard, several researches have been conducted for determination of different antibiotic residues in milk using various traditional and chromatographic methods. In this study, an efficient method for determining the residual levels of some sulfonamides in pasteurized milk was developed and presented.

**Materials and Methods:** After dispersive solid-phase extraction combined with air-assisted liquid-liquid microextraction of analytes, the residues of sulfadiazine, sulfamethoxazole, and sulfamethazine in the pasteurized milk were determined using HPLC with a diode array detector. Following the evaluation of the effective factors in the extraction and optimizing them, the validation of method was carried out by calculating analytical parameters such as linear range, LOD, LOQ, repeatability, and extraction recovery.

**Results:** In the developed two-step extraction method, satisfactory figures of merit were obtained, therefore the method's linearity was shown with a coefficient of determination higher than 0.995. The limits of detection and measurement were less than 1.2 and 3.2 ng ml<sup>-1</sup>, respectively, which is less than the MRLs established for these antibiotics in milk. The analysis of real samples showed the presence of sulfamethoxazole in three milk samples in concentrations of 13±0.1, 9±0.2 and 9.6±0.5 ng ml<sup>-1</sup> and no other antibiotics were discovered in the examined samples.

**Conclusion:** Overall, the established approach is a sensitive, accurate and reliable method and has high efficiency in determining selected antibiotics in milk samples.

**Keywords:** Air Assisted Liquid Liquid Microextraction, Dispersive Solid Phase Extraction, High Performance Liquid Chromatography, Milk, Sulfonamides.

\* Corresponding Author: Khandaghi@iausa.ac.ir